

FUSIONPROTEINS WITH PARTS OF IMMUNOGLOBULINS, THEIR PRODUCTION**Publication number:** KR100249572 (B1)**Publication date:** 2000-03-15**Inventor(s):** LAUFFER LEANDER [DE]; OQUENDO PATRICIA [PE]; ZETTLMEISSL GERD [DE]; SEED BRIAN [US]**Applicant(s):** GEN HOSPITAL CORP [US]; BEHRINGWERKE AG [DE]**Classification:**

- international: C07K14/195; A61K 38/00; A61K39/395; A61P7/04; A61P9/00; A61P13/12; A61P37/02; A61P37/08; C07K1/22; C07K14/005; C07K14/47; C07K 14/505; C07K14/52; C07K14/53; C07K14/535; C07K 14/54; C07K14/545; C07K14/55; C07K14/705; C07K 14/71; C07K14/715; C07K14/745; C07K16/00; C07K 19/00; C12N5/10; C12N9/64; C12N15/09; C12N15/62; C12P21/02; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/68; C12R1/91; C07K14/195; A61K38/00; A61K39/395; A61P7/00; A61P9/00; A61P13/00; A61P37/00; C07K1/00; C07K14/005; C07K14/435; C07K 16/00; C07K19/00; C12N5/10; C12N9/64; C12N15/09; C12N 15/62; C12P21/02; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/68; (IPC1-7): C07K15/18

- European: C12N9/64F2C21M90; C07K14/47; C07K14/505; C07K14/715F; C07K14/745; C07K16/00; C12N15/62

Application number: KR19910010844 19910628**Priority number(s):** DE19904020607 19900628**Also published as:**

EP0464533 (A1)

EP0464533 (B1)

UY25897 (A1)

PT98113 (A)

PT98113 (B)

more >>

Abstract not available for KR 100249572 (B1)

Abstract of corresponding document: EP 0464533 (A1)

The invention relates to genetically engineered soluble fusion proteins consisting of human proteins or parts thereof not belonging to the immunoglobulin family and various portions of the constant region of immunoglobulin molecules. The functional properties of both fusion components are surprisingly retained in the fusion protein.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. ⁶ C07K 15/18	(45) 공고일자 2000년03월15일 (11) 등록번호 10-0249572 (24) 등록일자 1999년12월27일
(21) 출원번호 10-1991-0010844 (22) 출원일자 1991년06월28일	(65) 공개번호 특 1992-0000789 (43) 공개일자 1992년01월29일
(30) 우선권주장 P4020607.6 1990년06월28일 독일(DE) (73) 특허권자 더 제너럴 하스피탈 코포레이션 어니스트 엠. 해데드 미국 메사추세츠 02129 찰스토운 슈트 1101빌딩 149 써틴스 스트리트베링베 르케 악티엔 개젤샤프트 필립 슈타인, 헤리베르트 부그 독일연방공화국 데-3550 마브르크 1 포스토파치 1140 (72) 발명자 린더라우퍼 독일연방공화국 데-3550마르부르크발터-포스-베그4 파트리치아오쿠엔도 독일연방공화국 데-3550마르부르크발터-포스-베그4 게르트체틀마이슬 독일연방공화국 데-3551란탈-그로스펠덴암호파커 15 브라이언시드 미합중국매사추세츠02114보스톤웰만빌딩프루트스트리트 (74) 대리인 이병호	
심사관 : 한현숙	

(54) 면역글로불린 부분을 갖는 융합 단백질 및 이의 제조방법

요약

본 발명은 면역글로불린 계통군에 속하지 않는 사람 단백질 또는 이의 일부, 및 면역글로불린 분자의 불변부의 다양한 부분으로 이루어지는, 유전공학적으로 처리된 가용성 융합 단백질에 관한 것이다. 놀랍게도, 2개의 융합 파트너의 작용성 특성이 융합 단백질내에 보유된다.

대표도

121 GTCGCTCGGAGCTCCCTGCTGGGCTGGGTCTTCGCCAGGTTGCCGCCGCTTCAAGGCACT 100
CAACGAGCCCTGCCEAGGACGAGCCAGAACCGGCTCCACCGGCCGCGAAAGCTCCGCTGA
줄이고뉴클레오파이드 1

181 ACAAAATACTGTGGCAGCATATAATTAACTTGGAAATCAACTAATTCAAGACAATTTTG 240
TGTTTATGACACCGCTCTATATAAATTGACCTTTAGTTGATTAAGCTCTGTTAAAC

줄이고뉴클레오파이드 2
181 AACTACTTTTCAGTGTCAAGCAGTGTATCCCTCCGGAAACAGTTAACCGGAAAGTACA 780
TTGATGACAAAGTCACAAAGTTCTGTCAGTAAGGGAGGGCTTGTCAATTGGCTTCTCATGT

영세서

[발명의 명칭]

면역글로불린 부분을 갖는 융합 단백질 및 이의 제조방법

[도면의 간단한 설명]

제1도는 트롬보플라스틴 cDNA를 클로닝하기 위해 사용되는 서열로부터 유도된 2개의 올리고뉴클레오파이드 프로브 분자를 나타낸 것이다.

제2도는 트롬보플라스틴 아미노산 서열을 갖는 클론 2b-Apr 5의 전체 서열을 도시한 것이다.

제3도는 트롬보플라스틴 cDNA의 5'-비해독 영역 또는 암호화영역에 있는 서열과 하이브리드화 할 수 있는 합성된 2개의 올리고뉴클레오파이드를 나타낸 것이다.

제4도는 하이브리드 플라즈미드 pTF1Fc 5364를 도시한 것이다.

제5도는 IL-4 수용체 cDNA의 5'-비해독 영역 또는 암호화 영역에 있는 서열과 하이브리드화 할 수 있는 합성된 2개의 올리고뉴클레오타이드를 나타낸 것이다.

제6도는 하이브리드 플라즈미드 pIL 4RFc 5364를 도시한 것이다.

제7도는 에리트로포이에틴(EPO) cDNA의 개시 코돈의 근처에 있는 서열 및 정지코돈의 근처에 있는 서열과 하이브리드화 할 수 있는 합성된 2개의 올리고뉴클레오타이드를 나타낸 것이다.

제8도는 하이브리드 플라즈미드 pEPOFc 5159를 도시한 것이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 면역글로불린 계통군에 속하지 않는 사람 단백질 또는 이의 일부, 및 면역글로불린 분자의 불변부의 다양한 부분으로 이루어지는, 유전공학적으로 처리된 가용성 융합 단백질에 관한 것이다. 놀랍게도, 2개의 융합 파트너의 작용성 특성이 융합 단백질내에 보유된다.

유럽 공개특허공보 제0 325 262 호 제0 314 317호에는 사람 T 세포의 CD4 막 단백질의 다양한 도메인(domain) 및 사람 IgG1 부분으로 이루어진 이에 상응하는 융합 단백질이 기술되어 있다. 이를 융합 단백질중 몇몇은 세포-결합된 CD4 분자와 동일한 친화도로 사람 면역결핍 바이러스의 당단백질 gp120에 결합한다. CD4 분자는 면역글로불린 계통군에 속하므로, 결과적으로 면역글로불린 분자의 구조와 매우 유사한 3차 구조를 갖는다. 이러한 유사한 3차 구조는 또한 T-세포 항원 수용체의 α -쇄에 대해서도 적용되는데, 이러한 융합이 또한 다음 문헌에 기술되어 있다[참조: Gascoigne 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 84(1987), 2937-2940]. 그러므로, 매우 유사한 도메인 구조에 근거하여, 이 경우에, 융합 단백질에서의 2개의 융합 파트너의 생물학적 활성의 보유가 예상되었다.

바람직하게는, 면역글로불린의 불변부의 아미노 말단에 커플링되어 있는, 본 발명에 따른 사람 단백질은 면역글로불린 계통군에 속하지 않으며 하기 부류, 즉(i) 세포외 도메인이 융합해서 전적으로 또는 부분적으로 훈입되어 있는 막-결합 단백질[특히, 트롬보플라스틴 및 시토킨 수용체 및 성장 인자 수용체(예: 인터루킨-4, 인터루킨-7, 종양괴사인자, GM-CSF, G-CSF, 에리트로포이에틴에 대한 세포성 수용체)가 있다];(ii) 융합에서 전적으로 또는 부분적으로 훈입되는 막-결합되지 않은 가용성 단백질로 나뉘어진다. 특히, 치료학상 중요한 단백질은 예를 들어, 에리트로포이에틴 및 기타 시토킨 및 성장 인자들이다.

융합 단백질은 공지된 원핵 및 진핵 발현 시스템에서 제조될 수 있지만, 바람직하게는 포유동물 세포(예: CHO, COS 및 BHK 세포)에서 제조될 수 있다.

본 발명에 따른 융합 단백질은 그들의 면역글로불린 부분 때문에, 천화 크로마토그라피에 의해 정제하기가 용이하며 생체내에서 개선된 약물동력학적 특성을 갖는다.

많은 경우에서, 융합 단백질에서의 Fc 부분은 치료 및 진단에서 사용하기에 상당히 유리하므로, 예를 들어, 개선된 약물동력학 특성을 초래한다[참조: 유럽 공개특허공보 제0 232 262호]. 한편, 어떤 용도를 위해서는, 융합 단백질을 발현시키고 탐침하고 정제한 후에 기술된 유리한 방법으로 Fc 부분을 제거하는 것이 바람직할 것이다. 이것은 Fc 부분이 치료 및 진단에서 사용하기에는 방해울임이 일증되는 경우, 예를 들어, 융합 단백질이 면역반응에서 항원으로서 사용되는 경우에 해당된다.

상기 목적을 위해 사용하는 것이 가능할 수 있는, 현존의 다양한 프로테아제가 있다. 예를 들어, 면역글로불린으로부터 F(ab) 단편을 생성시키기 위해 파파인 및 펩신이 사용되지만[참조: Immunology, ed. Roitt, I. 등, Gower Medical Publishing, London(1989)], 이들은 특정하게 특이적 방식으로 절단하지는 않는다. 대조적으로 융합인자 Xa는 단백질에서 비교적 희귀한 테트라펩티드 서열 Ile-Glu-Gly-Arg을 인지하고 아르기닌 잔기 다음에 단백질의 가수분해적 절단을 수행한다. 언급된 테트라펩티드를 함유하는 서열은 나가이(Nagai) 및 토게르센(Thogersen)에 의해 유전 공학적 방법으로 하이브리드 단백질에 최초로 도입되었다[참조: Nagai, K. 및 Thogersen, H.C., Nature, vol. 309(1984), 810-812]. 상기 저자들은 이 클라이에서 발현된 단백질이 실제로 인자 Xa에 의해 특이적으로 절단되는 것을 보여줄 수 있었다. 하지만, 이러한 단백질이 또한 진핵세포, 특히, 동물세포에서 발현되어 정제후에 인자 Xa에 의해 절단되는 가능성에 대해서는 아직까지 공개된 예가 없다. 그러나 동물 세포에서의 본 발명에 따른 단백질의 발현이 바람직한데, 이는 상기 태입의 세포 시스템에서만, 예를 들어, 정상적으로, 천연구조를 보유하므로 생물학적 활성을 보유한 융합 파트너로서의 막-결합 수용체의 분비가 예상되기 때문이다. 세포 배양 상 총액으로의 분비는 융합 단백질의 후속의 간단한 정제를 촉진시켜준다.

따라서, 본 발명은 면역글로불린 계통군에 속하지 않는 사람 단백질 또는 이의 일부, 및 여러가지 아류의 면역글로불린(IgG, IgM, IgA, IgE)의 중쇄 또는 경쇄의 불변부의 다양한 부분으로 구성된, 유전공학적으로 처리된 가용성 융합 단백질에 관한 것이다. 사람 IgG, 특히 바람직하게는 사람 IgG1의 중쇄의 불변부가 면역글로불린으로서 바람직하며, 여기서 융합은 힌지영역(hinge region)에서 발생한다. 특정 양태에서, Fc 부분은, 또한 훈입되는 절단 서열에 의해 간단한 방법으로 제거될 수 있고 인자 Xa를 사용하여 절단될 수 있다.

또한, 본 발명은 유전공학적으로 상기 융합 단백질을 제조하는 방법, 및 진단과 치료를 위한 이의 용도에 관한 것이다.

최종적으로, 본 발명은 추가의 실시예에서 설명된다.

[실시예 1]

트롬보플라스틴 융합 단백질:

응혈은 인체에서 가장 중요한 과정이다. 응혈 캐스케이드(cascade)의 적당하게 예민한 조절이 있는데, 여기에는 다수의 세포성 인자와 혈장 단백질이 함께 작용한다. 전체로서의 상기 단백질(및 이의 보조인자들)이 응혈인자로 불리워진다. 응혈 캐스케이드 최종 생성물은 혈소판의 응집을 유발시키는 트롬빈, 및 혈소판 혈전을 안정화시키는 피브린이다. 트롬빈은 피브리노겐으로부터의 피브린의 형성을 촉매하여 스스로는 프로트롬빈의 제한된 단백질 분해에 의해 형성된다. 활성화된 인자 X(인자 Xa)는 상기 단계에 관여하여, 인자 Va 및 칼슘 이온의 존재하에서, 혈소판 막에 결합하여 프로트롬빈을 절단시킨다.

인자 X가 활성화되기 위해서는 2가지 경로, 즉, 외성 경로와 내성 경로가 존재한다. 내성 경로에서는, 일련의 인자들은 단백질분해에 의해 활성화되어 그들 각각이 활성 프로테아제를 형성한다. 외성 경로에서는, 손상된 세포에 의해 트롬보플라스틴(조직 인자)의 합성이 증가되고, 증가된 트롬보플라스틴이 인자 VIIa 및 칼슘 이온과 함께 인자 X를 활성화시킨다. 트롬보플라스틴의 활성은 상기 반응에만 한정된다고 앞서 가정되었었다. 그러나, 트롬보플라스틴/VIIa 복합체는 또한 인자 IX의 수준에서 내성 경로를 활성화시키는 것을 방해한다. 따라서, 트롬보플라스틴/VIIa 복합체는 응혈의 가장 중요한 생리학적 활성제 중의 하나이다.

그러므로, 트롬보플라스틴은 이의 진단 보조제(하기 참조)로서의 용도와는 별도로, 선천성 또는 후천성 응혈 결핍증을 치료하기 위한 치료학적 약제의 성분으로서 또한 사용될 수 있다고 생각할 수 있다. 이러한 예는 인자 VIII, LX 또는 XI의 결핍에 의해 야기되는 만성 혈우병 또는, 예를 들어, 간 또는 신장 질병의 결과로 초래되는 그 밖의 급성 응혈 장해이다. 외과 수술 개입후의 치료학적 약제로서의 용도를 또한 생각할 수 있다.

트롬보플라스틴은 면역글로불린 계통군에 속하지 않는 온전한 막 단백질이다. 트롬보플라스틴 cDNA 서열은 총 4개의 그룹에 의해 공개되었다[참조: Fisher 등, Thromb. Res., vol. 48(1987), 89-99; Morrissey 등, Cell, vol. 50(1987), 129-135; Scarpati 등, Biochemistry, vol. 26(1987), 5234-5238; Spicer 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 84(1987), 5148-5152]. 트롬보플라스틴 cDNA는 295개 아미노산 잔기의 폴리펩티드를 암호화하고, 이의 32개의 N-말단 아미노산이 시그널 펩티드로서 작용하는 개방 판독 프레임(open reading frame)을 함유한다. 성숙한 트롬보플라스틴은 263개의 아미노산 잔기를 포함하고 3개-도메인 구조, 즉 i) 아미노 말단 세포외 도메인(219개의 아미노산 잔기); ii) 막횡단 영역(23개의 아미노산 잔기); iii) 세포질 도메인(카복실 말단; 21개의 아미노산 잔기)를 갖는다. 세포외 도메인에는, N-글리코실화를 위한 3개의 포센설 부위가 존재한다(Asn-X-Thr). 트롬보 플라스틴은 정상적으로 글리코실화되지만 글리코실화는 단백질의 활성을 위해 필수적인 것으로 보이지는 않는다[참조: Paborovsky 등, Biochemistry, vol. 29(1989), 8072-8077].

트롬보플라스틴은 응혈의 진단상 시험에서 혈장 샘플에 대한 보조제로서 요구된다. 시험받는 환자의 응혈 상태는 1-단계 프로트롬빈 혈병 형성 시간 결정에 의해 알 수 있다(예: Quick's test). 진단상 시험에 요구되는 트롬보플라스틴은 현재 사람 조직으로부터 획득하며, 제조방법은 표준화하기 어렵고, 수율은 낮아서 상당한 양의 사람 출발물질(태반)이 공급되어야만 한다. 한편, 천연의 막-결합 트롬보플라스틴의 유전 공학에 의한 제조는 복잡한 정제 방법 때문에 또한 어려울 것이라 예상된다. 상기 문제점들은 면역글로불린 부분으로의 본 발명에 따른 융합에 의해 회피될 수 있다.

본 발명에 따른 트롬보플라스틴 융합 단백질은 포유동물 세포(예: CHO, BHK, COS 세포)에 의해 배양 배지로 분비되고 단백질 A-세파로조상에서의 전화 크로마토그래피로 정제되며 1-단계 프로트롬빈 혈병 형성시간 결정에서 높은 활성을 갖는다.

트롬보플라스틴 cDNA의 클로닝

공개된 서열[참조: Scarpati 등, Biochemistry, vol. 26(1987), 5234-5238]을 트롬보플라스틴 cDNA를 클로닝하는데 사용한다. 2개의 올리고뉴클레오타이드 프로브 분자는 제1도 참조)가 이를 공개된 서열로부터 유도된다. 상기 2개의 프로브 분자는 사람 태반으로부터 cDNA 뱅크를 스크리닝하는 데 사용한다[참조: Grundmann 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 83(1986), 8024-8028].

다양한 길이의 cDNA 클론을 수득한다. 후속의 과정에서 사용되는 하나의 클론인 2b-Apr5는 스카르파티(Scarpati)등에 의해 기술된 cDNA와 동일한 아미노산 서열을 암호화한다.

트롬보플라스틴 융합 단백질을 암호화하는 하이브리드 플라즈미드 pTF1Fc의 제작

플라즈미드 pCD4E 감마 1(유럽 공개특허공보 제0 325 262 A2호; ATCC에 수탁번호 제67610호로 기탁되어 있음)을 사람 CD4 수용체 및 사람 IgG1으로 구성된 융합 단백질을 발현시키는데 사용한다. CD4의 세포외 도메인을 암호화하는 DNA 서열은 제한 효소 HIND III 및 BamHI를 사용하여 상기 플라즈미드로부터 제거한다. 이 경우에, 단지 부분적 절단 만을 효소 HindIII를 사용하여 수행하여, pCD4E 감마 1에 함유되어 있는 2개의 HindIII 부위중 단지 1개(위치 2198)만을 절단해야 한다. 결과로 전핵세포 전사조절서열(프로모터)이 개방 HindIII 부위에 이어지는 개방된 백터에 초래된다. 개방 BamHI 부위는 펜타-펩티드 링커를 위한 암호화 영역의 출발점에 위치하고 힌지와 사람 IgG1의 CH2 및 CH3 도메인이 그뒤에 이어진다. BamHI 인지 서열 GGATCC에서 판독 프레임은 GAT가 아스파르트산으로서 해독되도록 하는 것이다.

열안정성 DNA 폴리머라제를 사용한 DNA 증폭은 목적하는 서열이 한쪽 말단 또는 양쪽 말단에서 부착되도록 하는 방식으로 소정의 서열을 변형시킬 수 있다. 트롬보플라스틴 cDNA의 5'-비해독 영역(A: 5' GATCGATTAAGCTTCGGAAACCCGCTCGATCTCGCCGCC 3') 또는 암호화 영역(B: 5' GCATATCTGGATCCCCGTAGAATTTCTCTGAATTCCCC 3')에 있는 서열과 하이브리드화 할 수 있는 2개의 올리고뉴클레오타이드를 합성한다. 이들중에서, 올리고뉴클레오타이드 A는 암호화쇄의 서열과 부분적으로 동종성이고 올리고뉴클레오타이드 B는 비-암호화쇄와 부분적으로 동종성이다(제3도 참조).

그리하여, 증폭을 통해(암호화쇄를 기준으로 하여) 양호화 서열의 출발점전의 5' 말단에 있는 HindIII 부위 및 막횡단 영역의 첫번째 3개의 아미노산 잔기를 위한 코돈후의 3' 말단에 있는 BamHI 부위를 함유하는 DNA 단편(827 bp)을 수득한다. BamHI 절단 부위에 있는 판독 프레임은 pCD4E 감마 1에 있는 BamHI 부

위와의 연결이 트롬보플라스틴 cDNA의 개시 코돈에서부터 IgG1 중쇄의 정지코돈에 걸쳐 연속적인 판독 프레임과의 유전자 융합을 초래하도록 하는 것이다. 목적하는 단편을 수득하고 HindIII 및 BamHI으로 처리한 후, 상기와 같이 HindIII(부분적으로) 및 BamHI으로 절단시킨 벡터 pCD4E 감마 1으로 연결시킨다. 생성된 플라즈미드를 pTF1Fc라고 명명한다(제4도 참조)

포유동물 세포로의 pTF1Fc의 형질감염

플라즈미드를 pTF1Fc에 의해 암호화된 융합 단백질은 이후로 pTF1Fc로 명명한다. pTF1Fc는 COS 세포에서 일시적으로 발현시킨다. 이 목적을 위해, COS 세포를 DEAE-덱스트란의 보호하에 pTF1Fc로 형질감염시킨다[참조: 유럽 공개특허公报 제0 325 262호]. 간접 면역형광법 조사는 형질감염된 세포의 비율이 약 25%임을 나타내었다. 형질감염시킨지 24시간 후에, 세포를 혈청없는 배지로 옮긴다. 이 세포 상층액을 3일 이 더 지난 후에 수거한다.

세포 배양 상층액으로부터 pTF1Fc 융합 단백질의 정제

일시적으로 형질감염된 COS 세포로부터의 상층액 170ml을 0.8mI의 단백질 A-세파로즈를 함유한 컬럼에서 배치 방법으로 4°C에서 밤새 수집하고, 10배 용적의 세척 완충액(50mM 트리스 완충액(pH 8.6), 150mM NaCl)으로 세척하고 용출 완충액(93:7 100mM 시트르산: 100mM 시트르산 나트륨)을 사용하여 0.5mI의 분획으로 용출시킨다. 처음의 9개 분획을 각 경우마다 2M 트리스 완충액(pH 8.6) 0.1mI를 사용하여 즉시 중화시킨후 훈합하여, 생성된 단백질을 아밀론 미소농축기(Amicon microconcentrator)(Centricon 30)에서 3회 농축/희석 주기를 수행함으로써 TNE 완충액(50mM 트리스 완충액(pH 7.4), 50mM NaCl, 1mM EDTA)으로 옮긴다. 이런 방법으로 수득된 pTF1Fc를 SDS-PAGE 전기영동에 의해 정제한다[참조: U.K. Lammi, Nature 227(1970) 680-685]. 환원제의 부재하에서, pTF1Fc는 SDS-PAGE에서 이량체(약 165kDa)처럼 나타난다.

프로트롬빈 혈병 형성 시간 결정에서 정제된 TF1Fc의 생물학적 활성

TF1Fc 융합 단백질은 1-단계 프로트롬빈 혈병 형성 시간 결정에서 낮은 농도(50ng/ml 미만)에서 활성이 있다[참조: Vinazzer, H. Gerinnungsphysiologie und Methoden im Blutgerinnungslabor(1979), Fisher Verlag Stuttgart]. 달성된 혈병 형성 기간은 사람 태반으로부터 분리된 트롬보플라스틴을 사용한 경우 수득한 혈병 형성 시간과 비교한다.

[실시예 2]

인터루킨-4 수용체 융합 단백질

인터루킨(IL-4)는 T 세포에 의해 합성되며 B-세포 증식을 자극할 수 있기 때문에 초기에는 B-세포 성장 인자로 명명되었다. 인터루킨(IL-4)은 상기 세포들에게 많은 영향을 끼쳤다. 특히 한가지는 활성화된 B 세포에서 면역글로불린 아류인 IgG1 및 IgE의 분자의 합성을 자극하는 것이다[참조: Coffmann 등, Immunol. Rev., vol. 102(1988) 5]. 또한, IL-4는 T 세포 및 기타 헤모포이아틱 세포(hemopoietic cell)의 증식 및 분화를 조절한다. 그리하여, 알레르기성 반응 및 기타 면역학적 반응의 조절에 기여한다. IL-4는 특정 수용체에 높은 친화도를 가지고 결합된다. 사람 IL-4를 암호화하는 cDNA가 분리되었다[참조: Idzlerda 등, J. Exp. Med., vol. 171(1990) 861-873]. IL-4 수용체가 시그널 펩티드로서 작용하는 25개의 N-말단 아미노산을 갖는 총 825개의 아미노산으로 구성되어 있다는 것이 cDNA 서열로부터 추론된 아미노산 서열의 분석으로부터 명백하다. 성숙한 사람 IL-4 수용체는 800개의 아미노산으로 구성되며 트롬보플라스틴처럼 3개-D메인 구조, 즉 i) 아미노 말단 세포외 도메인(207개의 아미노산); ii) 막횡단 영역(24개의 아미노산); 및 iii) 세포질 도메인(569개의 아미노산)을 갖는다. 세포외 도메인에는, N-글리코실화를 위한 6개의 포텐셜 부위가 존재한다(Asn-X-Thr/Ser). IL-4 수용체는 사람 IL-6 수용체, 사람 IL-2 수용체의 β-서브 유니트, 마우스 애리트로포이에인 수용체 및 랙트 프로락틴 수용체와 동종성을 갖는다[참조: Idzlerda 등, loc. cit.]. 그리하여, 트롬보플라스틴처럼, 면역글로불린 계통군의 일원이 아니고 헤마토포이에탄 수용체의 신규 계통군으로 언급되는 동종성 단백질과 함께 할당된다. 상기 계통군의 일원은 4개의 시스테인 잔기를 가지며 통상 막횡단 영역 근처에 위치하는 세포외 도메인에 보존 서열(Trp-Ser-X-Trp-Ser)을 갖는다.

IL-4/IL-4 수용체 시스템의 상기 언급된 작용을 근거로 하여, IL-4 중개된 면역 반응(예: 이식거부반응, 자가면역질병, 알레르기성 반응)을 억제하기 위한 IL-4 수용체의 재조합 형태의 치료학적 용도가 가능하다.

치료하기 위해 요구되는 물질의 양은 유전공학적으로 이러한 분자를 제조하는 것이 필수적이도록 한다. 친화 크로마토그라피에 의한 간단한 정제 및 개선된 약물동력학적 특성으로 인해, 본 발명에 따른, 면역 글로불린 융합 단백질로서의 가용성 형태의 IL-4 수용체의 합성은 특히 유리하다.

IL-4 수용체 융합 단백질은 포유동물 세포(예: CHO, BHK, COS 세포)에 의해 배양 배지로 분비되고 단백질 A-세파로즈상에서 친화 크로마토그래피에 의해 정제되며, 놀랍게도, 온전한 막-결합 IL-4 수용체 분자의 세포외 도메인과 동일한 작용성 특성을 갖는다.

IL-4 수용체 융합 단백질을 암호화하는 하이브리드 플라즈미드 pIL-4RFc의 제작

플라즈미드 pCD4E 감마 1을 Xhol 및 BamHI를 사용하여 절단하여 개방 Xhol 부위가 프로모터 서열로부터의 하부에 위치하는 개방된 벡터를 초래한다. 개방 BamHI 부위는 펜타펩티드 링커를 위한 암호화 영역의 출발점에 위치하고 헌지와 사람 IgG1의 CH2 및 CH3 도메인이 그위에 이어진다. BamHI 인지 서열 GGATCC에서 판독 프레임은 GAT가 아스파르트산으로 해독되도록 하는 것이다. 열안정성 DNA 폴리머라제를 사용한 DNA 증폭은 목적하는 서열이 한쪽 말단 또는 양쪽 말단에서 부착되도록 하는 방식으로 소정의 서열을 변형시킬 수 있다. 벡터 pDC302/T22-8[참조: Idzlerda 등, loc. cit.]에서 클론된 IL-4 수용체 cDNA의 5'-비해독 영역(A: 5' GATCCAGTACTCGAGAGAGAAGCCGGCGTGGTGGCTCATGC 3') 또는 암호화 영역(B: 5' CTATGACATGGATCCTGCTCGAAGGGCTCCCTGTAGGAGTTGTG 3')에 있는 서열과 하이브리드화 할 수 있는 2개의 올리

고뉴클레오타이드를 합성한다. 이들중에서, 올리고뉴클레오타이드 A는 암호화쇄의 서열과 부분적으로 동종성이고 올리고뉴클레오타이드 B는 비-암호화쇄와 부분적으로 동종성이다(제5도 참조). 열안정성 DNA 폴리머라제를 사용한 증폭은 암호화쇄를 기준으로 하여, 암호화 서열의 출발점 전의 5' 말단에 있는 Xhol 부위 및 세포외 도메인의 마지막 코돈전의 3' 말단에 있는 BamHI 부위를 함유하는 DNA 단편(836 bp)을 초래한다. BamHI 절단 부위에 있는 판독 프레임은 pCD4E 감마 1에 있는 BamHI 부위와의 연결이 IL-4 수용체 cDNA의 개시 코돈에서부터 IgG1의 중쇄의 정지코돈에 걸쳐 연속적인 판독 프레임과의 유전자 융합을 초래하도록 하는 것이다. 목적하는 단편을 수득하고, Xhol 및 BamHI으로 처리한 후, 상기와 같이 Xhol/BamHI으로 절단시킨 백터 pCD4E 감마 1에 연결시킨다. 생성된 플라즈미드를 pIL4RFC라고 명명한다(제6도 참조).

포유동물 세포로의 pIL4RFC의 형질감염

플라즈미드를 pIL4RFC에 의해 암호화된 융합 단백질은 이후로 pIL4RFC로 명명한다. pIL4RFC는 COS 세포에서 일시적으로 발현시킨다. 이 목적을 위해, COS 세포를 DEAE-덱스트란의 보조하에 IL4RFC로 형질감염시킨다[참조: 유럽 공개특허 공보 제0 325 262호]. 간접 면역형광법 조사는 형질감염된 세포의 비율이 약 25%임을 나타내었다. 형질감염시킨지 24시간 후에, 세포를 혈청없는 배지로 옮긴다. 이 세포 상층액을 추가의 3일 후에 수거한다.

세포 배양 상층액으로부터 pIL4RFC 융합 단백질의 정제

일시적으로 형질전환된 COS 세포로부터의 500ml의 상층액을 1.6ml의 단백질 A-세파로즈를 함유한 컬럼에서 배치 방법으로 4°C에서 밤새 수집하고, 10배 용적의 세척 완충액(50mM 트리스 완충액(pH 8.6), 150mM NaCl)으로 세척하고 용출 완충액(93:7 100mM 시트르산: 100mM 시트르산 나트륨)을 사용하여 0.5ml의 분획으로 용출 시킨다. 처음의 9개 분획을 각 경우마다 2M 트리스 완충액(pH 8.6) 0.1ml를 사용하여 즉시 중화시킨 후 훈합하여, 생성된 단백질을 아미콘 미소농축기(Centricon 30)에서 3회 농축/회석 주기를 수행함으로써 TNE 완충액(50mM 트리스 완충액(pH 7.4), 50mM NaCl, 1mM EDTA)으로 옮긴다. 이런 방법으로 수득된 IL4RFC를 SDS-PAGE 전기영동에 의해 정제한다[참조: U.K. Lammi, Nature 227(1970) 680-685]. 환원제의 부재 하에서, IL4RFC는 SDS-PAGE에서 이량체(약 150kDa)처럼 나타난다.

정제된 IL4RFC의 생물학적 활성

IL4RFC 단백질은 막-결합된 온전한 IL-4 수용체와 동일한 친화도($K_d = 0.5\text{nM}$)로 ^{125}I -방사선 표지된 IL-4에 결합한다. IL4RFC 단백질은 10 내지 1000ng/ml 농도에서 IL-4의 존성 세포주 CTLHuIL-4RI 클론 0[참조: Idzarda 등, loc. cit.]의 증식을 억제한다. 또한, IL4RFC 단백질은, 예를 들어, 래비트 항-사람 IgG로 미리 피복된 미세역가 플레이트에 Fc 부분을 경유하여 결합할 수 있고 또한 상기 형태에서 높은 친화도를 가지고 이의 리간드와 결합하기 때문에, IL-4 결합 검정을 개선시키는데 있어서 탁월하게 적합하다.

[실시예 3]

에리트로포이에틴 융합 단백질

성숙한 에리트로포이에틴(EPO)은 166개 아미노산으로 구성된 단단백질이고 적혈구의 발달에 필수적이다. 이것은 적혈구의 전구체 세포의 성숙 및 말단 분화를 자극한다. 사람 EPO에 대한 cDNA가 클론되었으며[참조: 유럽 공개특허공보 제0 267 678호] 이것은 성숙한 EPO의 166개의 아미노산 및 분비에 필수적인 22개의 아미노산의 시그날 펩티드를 암호화한다. cDNA는 유전자 조작된 포유동물 세포에서 재조합 작용성 EPO를 제조하는데 사용될 수 있으며 EPO는 다양한 원인의 빈혈증상(예: 급성 신부전증과 연관된 증상)의 치료를 위해 임상학적으로 사용될 수 있다.

간단한 정제 및 개선된 약물동력학적 특성 때문에, 본 발명에 따른 면역글로불린 융합 단백질로서의 EPO의 합성은 특히 유리하다.

에리트로포이에틴 융합 단백질을 암호화하는 하이브리드 플라즈미드 pEPORFc의 제작

이 제작은 실시예 2(섹션: IL-4 수용체 융합 단백질을 암호화하는 하이브리드 플라즈미드 pIL-4RFC의 제작)에 기술된 것과 유사하게 수행한다. 백터 pCES[참조: 유럽 공개특허 공보 제0 267 678호]에서 클론된 EPO cDNA의 개시코돈의 근처에 있는 서열(A: 5' GATCGATCTGAGATGGGGTGACGAATGTCCTGCCGTGTGG 3') 및 정지코돈의 근처에 있는 서열(B: 5' CTGAAATCGATCCCTGTCCCTCAGGCCCTCCCTGTACAGC 3')과 하이브리드화 할 수 있는 2개의 올리고뉴클레오타이드를 합성한다. 이들중에서, 올리고뉴클레오타이드 A는 암호화 쇄의 서열과 부분적으로 동종성이이고 올리고뉴클레오타이드 B는 비-암호화쇄와 부분적으로 동종성이다(제7도 참조). 열안정성 DNA 폴리머라제를 사용한 증폭은 암호화쇄를 기준으로 하여, 개시코돈의 앞쪽의 5' 말단에 있는 Xhol 부위를 함유하는 DNA 단편(598 bp)을 초래하는데, 여기서, EPO의 두 번째의 C-말단 아미노산 잔기에 대한 코돈(Asp)이 3' 말단에 BamHI 인지 서열로 존재한다. BamHI 절단 부위에 있는 판독 프레임은 pCD4E 감마 1에 있는 BamHI 부위와의 연결이 EPO cDNA의 개시 코돈에서부터 IgG1의 중쇄의 정지코돈에 걸쳐 연속적인 판독 프레임과의 유전자 융합을 초래하도록 하는 것이다. 목적하는 단편을 수득하고, Xhol 및 BamHI으로 처리한 후, 상기와 같이 Xhol/BamHI으로 절단시킨 백터 pCD4E 감마 1에 연결시킨다. 생성된 플라즈미드를 pEPORFc라고 명명한다(제8도 참조).

(57) 청구의 범위

청구항 1

IL-4 수용체, IL-7 수용체, G-CSF 수용체, GM-CSF 수용체 및 에리트로포이에틴 수용체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 시토kin 수용체 또는 성장 인자 수용체의 세포외 부분 또는 이의 일부, 및 IgG, IgM, IgA 및 IgE로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 면역글로불린 분자의 불변부로 이루어진 가용성 융합 단

백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 면역글로불린 부분이 사람 면역 글로불린 G(IgG) 중쇄의 물변부인 용할 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서, 면역글로불린 부분이 사람 IgG1 중쇄의 불변부 또는 이의 단백질 A-결합 단편인 융합 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, 융합이 헌지 영역(hinge region)에서 발생하는 융합 단백질.

청구항 5

제1항에 있어서, 면역글로불린에 융합된 단백질이 인터루킨-4(IL-4) 수용체의 세포외 부분 또는 이의 일부인 융합 단백질.

청구항 6

제1항에 있어서, 면역글로불린에 융합된 단백질이 IL-7 수용체의 세포외 부분 또는 이의 일부인 융합 단백질.

첨구할 7

제1항에 있어서, 면역글로불린에 융합된 단백질이 G-CSF 수용체의 세포외 부분 또는 이의 일부인 융합 단백질

첨구항 8

제1항에 있어서, 면역글로불린에 융합된 단백질이 GM-CSF 수용체의 세포외 부분 또는 이의 일부인 융합 단백질.

청구항 9

제1항에 있어서, 면역글로불린에 융합된 단백질이 에리트로포이에틴 수용체의 세포외 부분 또는 이의 일부인 융합 단백질.

첨구함 10

제1항 내지 4항, 제5항, 제6항 및 제7항 내지 제9항 중 어느한 항에 있어서, 인자 Xa 절단 부위가 면역글로불린 부분과 비-면역글로불린 부분 사이에 추가로 삽입되는 융합 단백질.

청구항 11

융합 단백질을 암호화하는 DNA를 포유동물세포 발현 시스템에 도입시키고 발현시킨 후, 생성된 융합 단백질을 면역글로불린 부분을 통한 친화 크로마토그라피에 의해 정제함을 특징으로 하여, 제1항에 청구된 융합 단백질을 제조하는 방법.

五
四

도면 1

123 GTCGCTCGGACGCTCTGCTCGGCTGGCTCTGCCTCCAGGGTGGCCAGGCTTGACT
 CABGGACGCTGCGAAGGACGACGCGAACCCAGAAACGGGGTCCACCCGCCGAAAGCTCGCTGA
 160
 181 ACAATACGTGCGCACCATATAATTAACTTGGAAATCAACTTAATTTCAAGGAACTTTTG
 TGTGTTATGACACCGCTCTATATAAATTGAAACCTTTAGTCATTAAAGGCTGTTAAACG
 240

율리고뉴클레오파이드 2
*****>
721 AACTACTGTTCACTGTTCAACCATGATTCTCCCTGGAAAGTGTAAACCGGAAAGTACA
TTGATGACAAAGTCACAAAGTCTGCTCAATAAGGGAACTGTTGCAATTGGCCCTCTCATGT > 780

도연2a

도면2b

610 630 650
 TTTGAACAGCTGGAAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAGAGATGAACGCCATTAGTCAGA
 PheGluLeuValAsnIleThrLysValAsnValThrValGluAspGluArgThrLeuValArg

 670 690 710
 AGGAAACACACTTCTAACCCCTCCGGGATGTTTGAGGACTTAATTATACACTT
 ArgAsnAsnThrPheLeuSerLeuArgAspValPheGlyLysAspLeuIleTyrThrLeu

 730 750 770
 TATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAAGGAAAGAAAAACAGCCTAAACAAACACTTAATGATT
 TyrIleAspSerSerSerSerGlyLysThrAlaLysThrAsnThrAsnGluPhe

 790 810 830
 TTGATTGTGTCGATAAAGGAGAAAAGTACTGTTTCAGTTCAACAGCTGGATTCCTCC
 LeuIleAspValAspLysGlyGluAsnTyrCysPheSerValGlyAlaValIleProSer

 850 870 890
 CGAACAGTTAACCGGAAAGAGTACAGCACGCCGGTAGAGCTGATGGCCGAGGAGAAAGG
 ArgThrValAsnArgLysSerThrAspSerProValGluLysMetIleGlnGluLysGly

 910 930 950
 GAATTTCAGAGAAAATTCATCATCATGGAGCTGTGGTATTGTGGTCATCATCCTTGTC
 GluPheArgGluIlePheIleGlyAlaValValValPheValValIleIleLeuVal

 970 990 1010
 ATCATCCTGGATATCTCTACACAAGTGTGAAAGGCCAGAGCTGGGGCACAGCTGGAAAG
 IleIleLeuAlaIleSerLeuHisLysCysArgLysAlaGlyValGlyGlnSerTrpLys

 1030 1050 1070
 GAGAACTCCCCACTGAATGTTCTAAAGGAGCACTGTGGAGCTACTGCAATGCTAT
 GluAsnSerProLeuAsnValSer

 1090 1110 1130
 ATTGCACTGTGACCGAGAACCTTTAAGAGGATAGAATACATGGAAACGCCAAATGAGTATT

 1150 1170 1190
 TGGGACATGGAAAGCCCTGGAGTTCATCAAGAAAAGTCTGATGATGAGCTTATTACATTAG

도면2c

1210 1230 1250
 CATTCTGGTTTGACATCAGCATTAGTCACCTTGAATGAACTAACGAATGGTACTACAACCA

 1270 1290 1310
 ATTCAGTTTAATTTTAAACCCATGGCACCTTTGCACATAACATGCTTGTAGATTAT

 1330 1350 1370
 ATATTCCGCCACTTAAGGATTAACCAGGTCGTCCAAGCAGAAAACAAATGGAAAAATGCTT

 1390 1410 1430
 AAAAAAATCCTGGGTGGACTTTGAAAAGCTTTTTTTTTTTTTTTGACGAGTC

 1450 1470 1490
 TTGCTCTGTTGCCAGGCTGGACTGCACTAGCACCGATCTCGCTCACTTGCACCCCTCCG

 1510 1530 1550
 CTCTCGGGTTCAAGCAATTCTGCTCAGTCAGTCAGGATTCAGGTTACAGGTCGCG

 1570 1590 1610
 ACTACCAACGCTAATTTGATTTTAGAGAGATGGGGTTTACCCATCTGGC

 1630 1650 1670
 CAGGCTGGCTTGAACTCCTGACCTCAGTGAATCCACCCACCTTGGCTCCAAAGATGCT

 1690 1710 1730
 AGTATTATGGCGTBAAACCAACCATGCCAGCGAAAAGCTTTGAGGGGCTGACTTCAT

 1750 1770 1790
 CCATGAGAAAGTAAATGAAAGGAATTGGGTGCACTTCTAGGACTTTCTAACATAT

 1810 1830 1850
 GTCTATAATATAGTGTAGTTAGGTTCTTTTCAGGAATACATTGGAAATTCAAAC

 1870 1890 1910
 ATTGGGCAAACCTTGTATTAATGTTAAGTGCAGGAGACATTGGTATTCGGCAGCT

도면2d

1930 1950 1970
 TCCTAATATGCTTACAATCTGACTTTAACCTGACTTAAGTGCATTAACATTTGAGAG

 1990 2010 2030
 CTAACATATTTTATAAGACTACTATACAAACTACAGAGTTTACATTAAAGTACTTA

 2050 2070 2090
 AAGCTTCTATGGTGACATTGATATATAATTTTTAAAGGTTTCTATATGGGAT

 2110 2130 2150
 TTCTATTTATGAGTAATATTCTCTATTTGATATATTGAGATAATTATTTAAT

 2170
 ACTTTAAATAAGGTTGACTGGGAATTGTT

도면3

HindIII
 5' GATCGTTAAAGCTTCGGAAACCCGCTCAATTCTCGCCACC 3' 음비고농공백오리아드 A

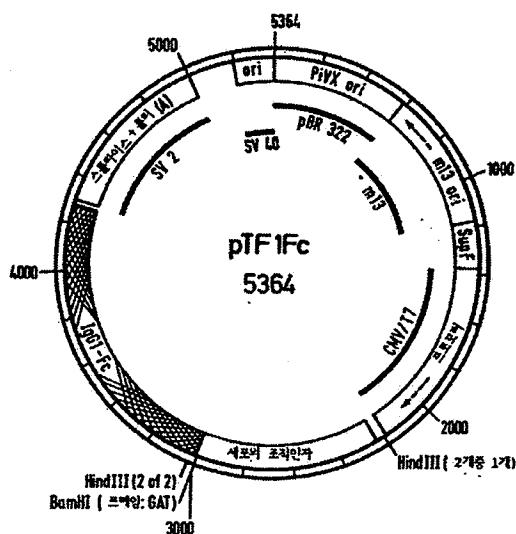
 AGCCCCACGGGCCGACGAGAACCCGCTCAATTCTCGCCACCAGCTGTAGAGACATGAG
 110 TCSSGGTGCCTGGCTGCAGCTAGAAGACGCGGTTAACCATCTTGACCTC
 MetGlu

 5'.. 비속단
 중합성
 단독 조제법
 (이그날 블리드)

 세포의 도메인 결합 | 약량단 영역의 출발점
 Glu(Glu)Leu(Gly)Ile(Pho)Arg(Glu)Ile(Pho)Tyr(Ile)Leu(Gly)Ala(Val)
 CAGGAAAAAGCCGAATTCAAGAGAAATAATTCTACATCATTCGGAGCTGCTG
 890 CCCCTTTCCCCCTTAAGTCCTTATAAGATGTTAGTAACTCGACACCA
 3' CCCCTTAAGTCCTTATAAGATGTTCCCTAGCTTATAGG 5' 음비고농공백오리아드

 BamHI

도면4



도면5

XbaI
 5' GATCCGATTCCTTAAAGAAAACCGGGCTTGCTGGCTCATGC 3' 을미고농물액오자이드 A
 -----||-----
 AGAGAAGCCCGGCTTGCTGGCTCATGCCTATAATCCCGCAACTTTGGAGGCTTGGCC
 61 TCTCTTCGCCCCAACCCCAAGTACCCATATTAACTGTGAAACCTCGAAGCTGCC
 -----5'----- 3'

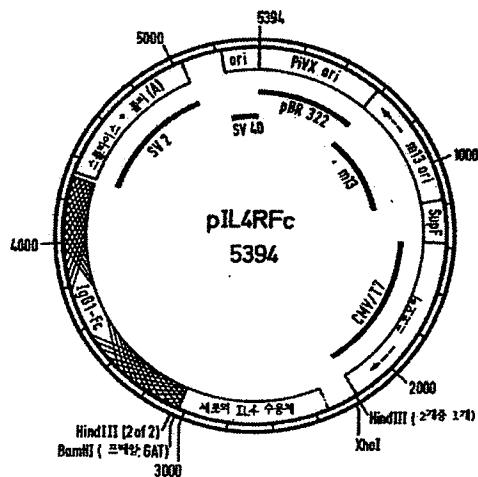
SacI
 5' GCAATCCTTAAAGATCAGGAGTTGAGACCCGCTGGCTGGCTTGGCATCTCCCAATGCC 380
 121 CCGCTAGTGAATCTAGTCCTCAAGCTCTGGTGGACCCACCGAACCTGAGGTTTACCC
 -----5'----- 3'

출발점
전독 즈베임 (시그널 패리드)

새로의 도메인 발현 | 악창단 영역의 출발점
 His4SerPyrArg5IUProPheGluIleIleLysGlyValSerValSerCys
 CACAACTCTCAAGGAAACCTTCGACCCACACTCTCTCTGGCTACGCTTTCCTCC
 839 ←—————+————— 888
 GTGTTGGGATGATCTCTCGGGAACTCTGTGGAGGACGACCCCAAGTCGCAAGGACG
 3' GTGTTGGGATGATCTCTCGGGAACTCTGTCTTAGGTAAGTAC 5' 을미고농물액오자이드 B

 BamH1

도면6



도연7

도면8

